

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表平11-514236

(43) 公表日 平成11年(1999)12月7日

(51) Int.Cl. <sup>8</sup>	識別記号	F I	
C 1 2 N 15/09	Z N A	C 1 2 N 15/00	Z N A A
C 0 7 K 14/325		C 0 7 K 14/325	
C 1 2 N 1/21		C 1 2 N 1/21	
// A 0 1 N 63/02		A 0 1 N 63/02	E
(C 1 2 N 15/09	Z N A		
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 40 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号	特願平9-516376	(71) 出願人	アンスティテュ、バストゥール フランス国パリ、リュ、デュ、ドクトゥール ルー、28
(86) (22) 出願日	平成8年(1996)10月28日	(71) 出願人	アンスティテュ ナショナル ド ラ ルシエルシュ アグロノミク フランス国パリ、リュ、ド、リュニベルシ テ、145
(85) 翻訳文提出日	平成10年(1998)4月27日	(72) 発明者	ブラボ、アレヤンドラ メキシコ国モレロス、62271、クエルナバ ッカ、アパートメント、510-3
(86) 国際出願番号	P C T / F R 9 6 / 0 1 6 8 4	(74) 代理人	弁理士 佐藤 一雄 (外2名)
(87) 国際公開番号	W O 9 7 / 1 5 6 7 7		
(87) 国際公開日	平成9年(1997)5月1日		
(31) 優先権主張番号	9 5 / 1 2 7 4 1		
(32) 優先日	1995年10月27日		
(33) 優先権主張国	フランス (F R)		
(81) 指定国	EP (A T, B E, C H, D E, D K, E S, F I, F R, G B, G R, I E, I T, L U, M C, N L, P T, S E), C A, J P, M X, U S		
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 *Bacillus thuringiensis* の新規菌株およびそれらを含む有害生物駆除組成物

(57) 【要約】

本発明は、特にシグマE ( $\sigma$  E) 遺伝子を発現し、かつ  
孢子形成を全くせず、または孢子形成をほとんどせず、  
または成育可能な孢子を産生しないことを特徴とする *Ba*  
*cillus thuringiensis* の菌株に関する。本発明は、*Baci*  
*llus thuringiensis* の上記菌株を含む有害生物駆除組成  
物にも関する。

## 【特許請求の範囲】

1. シグマE ( $\sigma$ ) 遺伝子を発現し、かつ孢子を形成せずまたは孢子をほとんど形成せず、または成育可能な孢子を産生しないことを特徴とする、Bacillus thuringiensis。

2. 菌株が孢子形成しないことを特徴とする、請求の範囲第1項に記載のBacillus thuringiensis。

3. シグマK 遺伝子を発現しない菌株であることを特徴とする、請求の範囲第1項または2項に記載のBacillus thuringiensis。

4. S i g K 遺伝子が、DNA配列の導入によって中断されており、または少なくとも部分的に欠失していることを特徴とする、請求の範囲第3項に記載のBacillus thuringiensis。

5. S i g K 遺伝子がこの菌株に対する正の選択特性を付与するDNA配列を導入することによって中断されていることを特徴とする、請求の範囲第4項に記載のBacillus thuringiensis。

6. 正の選択特性が抗生物質耐性であることを特徴とする、請求の範囲第5項に記載のBacillus thuringiensis。

7. B t 菌株が1以上のC r y 遺伝子を発現することを特徴とする、請求の範囲第1～6項のいずれか一項に記載のBacillus thuringiensis。

8. (1以上の) C r y 遺伝子が、ベクター、例えばプラスミドによって運ばれることを特徴とする、請求の範囲第7項に記載のBacillus thuringiensis。

9. C r y 遺伝子が染色体に組み込まれることを特徴とする、請求の範囲第7項に記載のBacillus thuringiensis。

10. 自己複製プラスミドによってまたは染色体に組み込まれたDNA配列によって運ばれる目的タンパク質を発現することを特徴とする、請求の範囲第1

～9項のいずれか一項に記載のBacillus thuringiensis。

11. 目的タンパク質を発現するS i g K 遺伝子中のDNA配列を含む事の特徴とする、請求の範囲第10項に記載のBacillus thuringiensis。

12. S i g K 遺伝子の全部または一部の代わりに目的のタンパク質を発現

するDNA配列を含むことを特徴とする、請求の範囲第10項に記載のBacillus thuringiensis。

13. 1995年10月26日にザ・ナショナル・コレクション・オブ・マイクロオーガニズム・カルチャーズ・オブ・ザ・インスティテュート・パスツール(the National Collection of Microorganism Cultures of the Institut Pasteur)に番号I-1634で寄託されたBacillus thuringiensis 407 SigK (pHT410)。

14. 1996年10月22日にザ・ナショナル・コレクション・オブ・マイクロオーガニズム・カルチャーズ・オブ・ザ・インスティテュート・パスツール(the National Collection of Microorganism Cultures of the Institut Pasteur)に番号I-1776で寄託されたBacillus thuringiensis Kto SigK (pHTF3-1C/A(b)-IRS-T-Δ)。

15. 請求の範囲第1～14項のいずれか一項に記載のBt菌株を含むことを特徴とする、有害生物駆除組成物。

16. Bt菌株が不活性化されていることを特徴とする、請求の範囲第15項に記載の組成物。

17. 物理的手段によって不活性化されていることを特徴とする、請求の範囲第15または16項に記載の組成物。

18. 照射によって不活性化されていることを特徴とする、請求の範囲第15または16項に記載の組成物。

19. 化学的手段によって不活性化されていることを特徴とする、請求の範囲第15または16項に記載の組成物。

20. Bt菌が、菌株の消化性を向上させるために、あるいはタンパク質への接近性を向上させるために処理されたことを特徴とする、請求項第15～19項のいずれか一項に記載の組成物。

21. Bt菌株が音波処理によって処理したものであることを特徴とする、請求の範囲第20項に記載の組成物。

22. SigE遺伝子を含み、任意の活性なSigK遺伝子を含まず、目的

(4)

特表平11-514236

遺伝子をコードする配列を含む、ヌクレオチド配列。

## 【発明の詳細な説明】

Bacillus thuringiensisの新規菌株およびそれらを含む有害生物駆除組成物

本発明は、Bacillus thuringiensis (バチルス チューリングゲンシス) の新規な菌株、それらを用いる有害生物駆除組成物、並びに目的のタンパク質を発現するためのこれらの菌株の使用に関する。

Bacillus thuringiensis (B t) は、特に多数の昆虫の幼虫に対して殺虫特性を有するタンパク質を産生するグラム陽性菌である。これらの細菌は、場合によっては不活性化の後に、穀物または疾患のベクターに有害な昆虫、特に蚊に作用することを意図した有害生物駆除組成物に用いられる。

現在では、B t 血清型 3 a 3 b が特に穀物の有害生物に対して用いられ、血清型 H 1 4 は蚊の幼虫を殺すのに用いられている。

Bacillus thuringiensisによって産生される有害生物駆除活性を有するタンパク質は $\delta$ -内毒素と呼ばれ、胞子形成の際に多量に産生される。それらはパラ胞子結晶性封入体の形態で蓄積し、胞子形成細胞の乾燥重量の25%まで存在することができる。

$\delta$ -内毒素の多数の遺伝子はクローニングされ、配列決定され、配列相同性および毒性スペクトルに基づいて5つの群に分類されている。相当する遺伝子は、c r y 遺伝子と呼ばれる。

Bacillus thuringiensisに基づいた処方物は、様々な商品名で30年近く生物学的有害生物駆除剤(biopesticides)として用いられてきた。生物学的抑制剤としてのBacillus thuringiensisの使用は、化学的有害生物駆除剤に関して多数の利点を有し、実際に、これは宿主スペクトルが狭くかつ極めて特異的であり、標的でない昆虫に対しては作用せず、またこれは脊椎動物または環境に望ましくない作用を持たない。

しかしながら、環境での $\delta$ -内毒素の持続性が僅かであり、処方物中に胞子が存在することは、Bacillus thuringiensisを基剤とする生成物を発売する上での2つの不都合な点である。これらの2つの問題を解決するために、特許出願EP-192, 319号明細書では、特にC r y 1 A c 毒素を発現するPseudomonas

fluorescens 型細胞を用いてあるいは特許出願PCT WO 94/25612号明細書には、spo0A遺伝子における冒された孢子形成しない突然変異体でCryIIA毒素を発現することによる細胞膜に毒素をカプセル封入することが提案されてきた。この後者の方法は、CryIII A遺伝子の発現の様式が他のCry遺伝子の発現の様式とは異なっているために可能であり、実際にこのCryII A遺伝子は、孢子形成の開始に関与しているすべての遺伝子または孢子形成に関与している因子とは独立している。

Bacillus thuringiensisにおいて、孢子形成はそれぞれシグマ [ $\sigma$ ] 35およびシグマ [ $\sigma$ ] 28と呼ばれる2種類のシグマ因子の発現によって変化し、Bacillus subtilisにおけるシグマ ( $\sigma$ ) Eおよびシグマ ( $\sigma$ ) K因子との相同性が大きいことを考慮して、以下において用いられるこの後者の名称は相当する遺伝子と同様に sigE および sigK と呼ぶ。

本発明は、 $\sigma$  Eを発現するが、孢子形成はしないか、または孢子形成をほとんどしないか、または成育可能な孢子を生成しないBacillus thuringiensisの菌株に関する。

本発明は、sigEを発現するが、sigKは発現しないBacillus thuringiensisの突然変異体が、相当する野生の菌株と実質的に同一の毒素を多量に産生するが、一方孢子形成はしないかまたは成育可能な孢子を生成しないという事実の実証に基づいている。

これは、詳細には菌株が sigK<sup>-</sup> 株である場合である。

このような菌株の構築は、1)生物学的有害生物駆除剤で処理する際の孢子の環境への散布が回避され、2)それらをカプセル封入するため環境での毒素の持続性が増加するという2つの利点を有する。

試験は、シグマK遺伝子 sigK<sup>-</sup> を発現しないBt株は、供給源菌株と同等な毒素を多量に蓄積することができるが、孢子は生成しない。これは、Cry遺伝子、または発現が $\sigma$  Eタンパク質の産生によって変化する関連遺伝子によってコードされる毒素をほぼ全量産生することができた。

Btの sigK<sup>-</sup> 突然変異体を得るには、任意のDNA配列を導入することに

よる挿入、または欠失、または *sigK* 遺伝子の相の変化による中断法を用いるのが特に有利であり、更に、このDNA配列を突然変異体を選択特性を付与するように選択することができ、例えば、これは中断を施した菌株が選択される抗生物質、特にカナマイシンに対する耐性であることができる。

*sigK*<sup>-</sup>突然変異体も同様に、調節領域を有するまたは持たない *sigK* 遺伝子のヌクレオチド配列に相当するヌクレオチド配列の総てまたは一部を欠失することによって得ることができる。

遺伝子の中断の技術は知られており、それらは本質的には *sigK* 遺伝子を運ぶDNA配列の水準で任意のDNA配列を導入することにより、菌株に導入される全体が相同組換えを生成し、*sigK* 遺伝子は中断された *sigK* 遺伝子によって置換されている。選択特性により、この時点で目的の突然変異体を選択することができる。

形質転換をしようとする菌株として極めて変化したまたは極めて顕著な毒素産生を有する *Bacillus thuringiensis* の菌株を選択するのが特に有利であるのはもちろんである。実際に、上記したように、*sigK* 遺伝子の中断の事実は、孢子形成を遮断するだけであり、毒素の産生は遮断しない。

*Bt* は、*Bacillus thuringiensis* の任意の菌株を意味するものとして理解される。

従って、中断を施そうとする菌株では、工業用菌株を用いることができる。例えば、Dulmage H.T. (1970) によって記載された *Bt* subsp. *kurstaki* HD-1、または *Bt israelensis*、または *Bt aizawai* 7-29 (この菌株は、第T07029号でIEBCから入手可能である) のような野生菌株である。

本発明は、更に詳細には、それぞれ1995年10月26日に第I-1634号でおよび1996年10月22日に第I-1776号でザ・ナショナル・コレクション・オブ・マイクロオーガニズム・カルチャーズ・オブ・ザ・インスティテュート・パスツール (the National Collection of Microorganism Cultures of the Institut Pasteur) に寄託された菌株 *Bacillus thuringiensis* 407 SigK<sup>-</sup> (pHT410) 並びに組換え体菌株 *Bacillus thuringiensis* Kto SigK<sup>-</sup> (pHTF3-IC/

A) (b)-IRS-T- $\Delta$ )に関する。

毒素の産生を増加させるために、本発明による s i g K<sup>-</sup> 菌株に自己複製プラスミド系を導入して、同様に専門家に知られている構築物によって上記毒素を確実に発現させることも可能である。



## 寄託微生物に関する情報

(PCT規則13a)

A. この情報は、3頁、32行目の記載に見られる微生物へ言及する	
B. 寄託物の同定	他の寄託物は追加シートの対象である
寄託機関の名称 インスティテュート・パスツール(INSTITUT PASTEUR)	
寄託機関の住所（郵便番号および国名を含む） 28 リュ・ドゥ・ドクトゥール・ルー 75015 パリ フランス	
寄託日 1995年10月26日	整理番号 I-1634
C. 追加情報（必要な場合）	追加シートはこの情報継続の目的で 添付される
D. 情報を提供しようとする国（情報が総ての指定国に提供されない場合）	
E. 別個に供給される情報（必要な場合）	
下記の番号の情報を国際事務局に続いて提供する（情報の一般的性質、例えば「寄託の整理番号」を明示する）	
受理事務所に保管 X このシートは国際出願と同時に 受理された	国際事務局に保管 このシートは下記の月日に国際事 務局に着信した
授権事務官 J. LE PICAUD	授権事務官

形式 PCT/RO/134 (1992年7月)

## 寄託微生物に関する情報

(PCT規則13a)

A. この情報は、3頁、33行目の記載に見られる微生物へ言及する	
B. 寄託物の同定	他の寄託物は追加シートの対象である
寄託機関の名称 インスティテュート・パスツール(INSTITUT PASTEUR)	
寄託機関の住所（郵便番号および国名を含む） 28 リュ・ドゥ・ドクトゥール・ルー 75015 パリ フランス	
寄託日 1996年10月22日	整理番号 I-1776
C. 追加情報（必要な場合）	追加シートはこの情報継続の目的で添付される
D. 情報を提供しようとする国（情報が総ての指定国に提供されない場合）	
E. 別個に供給される情報（必要な場合）	
下記の番号の情報を国際事務局に続いて提供する（情報の一般的性質、例えば「寄託の整理番号」を明示する）	
受理事務所に保管 X このシートは国際出願と同時に受理された	国際事務局に保管 このシートは下記の月日に国際事務局に着信した
授権事務官 J. LE PICAUD	授権事務官

形式 PCT/RO/134 (1992年7月)

この菌株によって発現されるタンパク質は、求められる有害生物駆除活性の種類に依存し、Cry Iは類に対して毒性を有し、Cry I Iは鱗翅類及び双翅類に対して毒性を有し、Cry I Vは双翅類に対して毒性を有する。

概していえば、*cryIC*、*cryIA*、*cryIVA*、*B*、*D*のような天然で所定数の毒素を発現する野生菌株の*sigK<sup>-</sup>*を生成することが可能である。また、本発明により記載された突然変異体菌株であって、*sigK<sup>-</sup>*でありかつ染色体またはプラスミドに組み込んだ後*Bt*ゲノムに関して同種または異種タンパク質をコードする遺伝子が発現する菌株を用いることも可能である。

利用可能な技術の実例は、*Biotechnology*, 1992, vol. 10, p. 418 (Lereclus et al) に記載されている。

遺伝子、例えば*cryIC*遺伝子を、同種組換えによって*Bt sigK<sup>-</sup>*に導入することができる。組換え体は、*cryIC*遺伝子を得るが、任意の異種DNAを保持しない。

このようにして、数種類の毒素遺伝子を相同組換えによって細菌染色体に加えることができ、または常在性プラスミドに組み込むことができる。

例えば、*Bt kurstaki* の菌株であって、それ自身のプロモーターの制御下で*cryIAC*遺伝子および*cryIIIA*遺伝子のプロモーターの制御下で*cryIC*遺伝子を同時に発現するものである。

これらの構造体で利用可能な*cry*遺伝子の中には、*cryI*、*cryII*、*cryIV*および*cyt*を挙げることができる。

発現される遺伝子の導入のもう一つの方法は、*pHT304*および*pHT315*プラスミドに関する特許出願PCT WO93/02199号明細書などに記載の*Bt*の機能的複製源を有するグラム陽性菌プラスミドを使用することからなっている。

本発明の方法によって得られる*sigK<sup>-</sup>*菌株は、場合によっては不活性化し

た後に、有害生物駆除組成物、特に幼虫、詳細には昆虫の幼虫を殺す目的で用いられる殺虫組成物に利用することができる。この有害生物駆除組成物は、自体知られている手法によって調製され、すなわちこれが必要な場合には、関連の*Bacillus*毒素の活性を最適にする不活性または非不活性担体との混合物として調製される。

ある国では、孢子形成菌株の利用に本質的な菌株の不活性化は、本発明に関し

て構築される *sig K*<sup>-</sup> 突然変異体の場合には任意である。この不活性化は、任意の物理的または化学的方法によって、特に照射によって行うことができ、これによって菌株を成育不可能とする。本発明による菌株は成育可能な胞子を持たず、それらの不活性化は、胞子形成した菌株の場合より容易である。

上記のように、毒素は細菌の内部に保持されているので、環境での毒素の有効期間を増加することができる（毒素は幼虫が細菌を消化する際にだけ放出される）。しかしながら、本発明によるある種の突然変異体は極めて例外的な耐性を有し、この場合には、選択された特異的な菌株を用いて処理を行う昆虫で良好に消化されるようにし、または例えば界面活性剤のような化学的処理、物理的処理、超音波処理、または生物学的処理、特定の要素を（遺伝子組換え技術などにより）微生物の壁に導入して、微生物が摂取されたときに毒素を一層良好に消化されまたは一層容易に接近し得るようにする必要があることを示すことが可能となった。

この *B t* の新規な菌株は、有害生物駆除組成物に要素の一つを供給することができるが、*B t* のゲノムに関して同種または異種遺伝子を発現するベクターとしても有用であり、上記遺伝子は、自己複製プラスミドによってまたは細菌のゲノムに関する相同組換えによって *B t* の *sig K*<sup>-</sup> 突然変異体でクローニングされる。

例えば、プロテアーゼ、リパーゼ、または任意の他の種類のタンパク質を発現することができるベクター系の構築は、特許出願 PCT WO 94/25612

号明細書に記載されているものと同様であることができる。

本発明は、*Sig E* 遺伝子を含み、任意の活性な *Sig K* 遺伝子を含まず、目的の遺伝子をコードする配列を含むヌクレオチド配列にも関する。

本発明の他の特徴および利点は、下記の実施例を読めば明らかになるであろう。

第1図は、*Bacillus thuringiensis* の *sig E* および *sig K* 染色体遺伝子の中断を表す。pAB1 および pAB2 プラスミドが相同組換えによって *B t* 染色体に組み込まれ、相同組換えの第二の場合には、総ての pRN5101 配列が失

われる。矢印はそれぞれアンピシリン、エリスロマイシンおよびカナマイシンに対する耐性を付与する遺伝子に相当する  $A^R$ 、 $E^R$ 、および  $K^R$  遺伝子の転写方向を示し、三角形はそれぞれ  $pBR322$  ( $ori^E$ ) の複製源および  $pE194ts$  ( $ori^t$ ) の複製源を表す。

第2図は、Bacillus thuringiensis における転写の分析のためのプラスミドの構築を表す。 $pHT304-18Z$  は以前に報告されている (Agaisse and Lereclus 1994b)。矢印は  $ermC$ 、 $bla$  および  $lacZ$  の転写方向、および  $E. coli$  ( $ori^E$ ) における機能的複製方向を示し、 $ori1030$  は  $Bt$   $pHT1030$  プラスミドの複製源であり (Lereclus and Arantes 1992)、破線矢印は上記のようにプロモーター  $psigE$ 、 $psigK$ 、 $Bt$  I および  $Bt$  II から開始した転写方向を示す (Rong et al., 1986; Sandman et al., 1988; Wong et al., 1983)。 $spoIID$ 、 $cotA$  および  $cryIAa$  遺伝子のプロモーター領域を有する  $HindIII$  -  $BamHI$  断片は、 $pHT304-18Z$  においてクローニングされている。

第3図は、 $spoIID$  および  $cotA$  遺伝子のプロモーターの制御下での  $Bt$  における  $\beta$ -ガラクトシダーゼの発現を表す。細胞は  $30^\circ\text{C}$  で  $SP$  培地で育成させ、時間 0 は対数増殖期の終了を示し、 $t_n$  は時間 0 の前または後の時間数である。 $A$  は  $pHTspoIID$  を有する  $Bt$  株の  $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性であり、

$B$  は  $pHTcotA$  を有する  $Bt$  株の  $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性である。 $\beta$ -ガラクトシダーゼの特異活性は  $Spo^+407$  (■)、 $407SigE$  (●)、および  $407sigK^-$  (○) で示される時間に測定した。

第4図は、 $30^\circ\text{C}$  の  $SP$  培地で育成した  $pHTcryIA2$  を有する  $Bt$  の菌株における  $cryIAa$  の制御下で指示された  $\beta$ -ガラクトシダーゼの発現を表す。 $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性は、 $Spo^+407$  (■)、 $407SigE$  (●)、および  $407sigK^-$  (○) で示される時間に測定し、

第5図は、 $pHTF3-1C/A(b)-IRS-T$  プラスミドを表す。このプラスミドは  $pBluescript^{II}KS^-$  から誘導され ( $pBluescript^{II}KS^-$  の DNA は「 $bla+ori^E$ 」ボックスによって表され)、 $pB$

l u e s c r i p<sup>II</sup>K S<sup>-</sup>、および Bacillus cereus 由来のテトラサイクリン耐性を付与する t e t 遺伝子の直ぐ両側に位置した T n 4 4 3 0 トランスポゾン (Lereclus et al., 1986) の内部分割部位 (internal resolution site) (I R S) を含む 2 個の配列を有し、これは、更に c r y<sup>III</sup> A の p 3 プロモーターの制御下で c r y I C / A (b) キメラ遺伝子のコード部分 (Agaisse and Lereclus, 1994)、および B. thuringiensis の p H T 1 0 3 0 プラスミドの複製源 (Lereclus and Arantes, 1992) を含んでいる。

第 6 図は、K t o S i g K<sup>-</sup> 菌株に含まれる T n 4 4 3 0 トランスポゾンの T n p I インテグラーゼによって触媒される 2 個の I R S 部位の間の組換え反応を表す。部位特異的組換えから生じるプラスミドは p H T F 3 - I C / A (b) - I R S - T - Δ と呼ばれる。

#### 実施例 1

##### 材料および方法

##### 細菌株および培地

B t 4 0 7 (血清型 H 1) およびそのアクリスタリフェラス誘導体 (acrySTALLiferous derivative) (C r y<sup>-</sup>) は、上記のように O. Arantes によって単離された (Lereclus et al., 1989)。E. coli K-12 株 T G 1 (Δ (l a c - p r o A B) s u p E t h i h u d D 5 (F' t r a D 3 6 p r o<sup>+</sup> p r o B<sup>+</sup> l a c l q l a c Z Δ M 1 5)) を、クローニング実験に用いる (Gibson, 1984)。B t 株を 3 0 °C でルリア培地 (L B)、および H C T 培地 (Lecadet et al., 1980)、または孢子形成栄養培地 (S P 培地) (Lereclus et al., 1995) で培養する。E. coli 株は、L B 培地で 3 7 °C で培養する。細菌選択のための抗生物質濃度は下記の通りである：アンピシリン、1 0 0 μ g / m l (E. coli に対する)；エリスロマイシン、5 μ g / m l (B t に対する)；カナマイシン、E. coli に対して 1 0 μ g / m l および B t に対して 2 0 0 μ g / m l。

##### プラスミドおよび DNA 断片

S. Gruss によって供給された p R N 5 1 0 1 プラスミドは、グラム陽性生物の熱感受性複製源プラスミドであり、これは p B R 3 2 2 の C l a I 部位に p E 1

94ts (Villafane et al., 1987)の挿入によって構築された。BluescriptプラスミドはStratageneから入手し、pHT304-18ZおよびpHT410プラスミド構築物は既に報告されている(Agaïsse and Lereclus 1994b; Lereclus et al., 1989)。Cry1Aa遺伝子のプロモーター領域を含む362bp断片の増幅に用いられるオリゴヌクレオチド(Cry1A-1およびCry1A-2)を、第1表に示す。Cry1A-1プライマーはHindIII制限部位を含む5'末端に7bpの伸長部を有し、Cry1A-2プライマーはBamHI制限部位を有する8bpの伸長部を有する。この2つの制限部位を導入して、pHT304-18Zにおけるクローニングを促進する。Bt sigEおよびsigK遺伝子を中断するため、相当する遺伝子の5'および3'領域を5'末端に適当な制限部位を有するオリゴヌクレオチドを用いるPCRによって増幅し、pBS KS<sup>-</sup>において別個にサブクローニングする。sigEおよびsigK

遺伝子の5'領域は、それぞれBamHI-XbaIの857および611bpの制限断片である。3'領域は、それぞれ807および606bpのEcoRI-BamHI制限断片である。これらの遺伝子のそれぞれの5'および3'領域を含むDNA断片を精製して、pRN5101プラスミドのBamHI制限部位におけるEnterococcus faecalisのaphA3遺伝子(Km<sup>r</sup>カセット)(Trieu-Cuot and Courvalin, 1983)を有する1.5kbのXbaI-EcoRI断片に結合する。生成する熱感受性プラスミドpAB1およびpAB2は、それぞれsigEおよびsigK遺伝子においてカナマイシン耐性遺伝子によって中断されたコピーを有する。

B. subtilisのspoIIDおよびcotA遺伝子のプロモーター領域をそれぞれ有するプラスミドpDG675およびpDG676は、Dr. P. Stragier (Institut de Biologie Physico-Chimique, パリ, フランス) から提供された。pHTspoIIDは、pHT304-18ZのHindIIIおよびBamHI制限部位の間のpDG675の300bpのHindIII-BamHI制限断片をサブクローニングすることによって構築した。pHTcotAは、下記のようにして

構築した。すなわち、pDG676のEcoRI-BamHI断片の400bpを最初にpBS KS<sup>-</sup>においてサブクローニングして、pKScotAを得る。次いで、pKScotAのHindIII-BamHI制限断片を、pHT304-18ZのHindIIIとBamHI制限部位の間でサブクローニングし、生成するプラスミドをpHTcotAという名称で呼ぶ。

#### 構築および形質転換

プラスミドDNAを、標準的なアルカリリーシス法によってE. coli から抽出する。染色体DNAを、以前に報告されている方法でBtから抽出する(Msadek et al., 1990)。制限酵素およびT4リガーゼは、New England Biolabs、ビバリー、マサチューセッツから入手する。DNA断片を、Prep-A-Gene キット(Bio

Rad Laboratories, リッチモンド, カリフォルニア)を用いてアガロースゲル上で精製する。オリゴヌクレオチドプライマーは、Genset (パリ、フランス)によって合成され、PCR増幅はGeneAmp PCR 2400装置(Perkin-Elmer, フォスターシティー, カリフォルニア)を用いて行う。PCR増幅に用いたDNAマトリックスは、Bt407から既にクローニングしたcryAa遺伝子(Lereclus et al., 1989)、または407 Cry<sup>-</sup>株から抽出した染色体DNAである。反応条件は下記の通りである。95℃で5分間インキュベーションした後、ハイブリダイゼーションのため57℃で1分間を30サイクル、伸長のため72℃で1分間、および変性のため92℃で1分間、最後に72℃で10分間新たなインキュベーションを行う。Taqポリメラーゼは、USB Laboratories (クリーブランド、オハイオ)から入手する。標準的手順を用いてE. coli の形質転換を行い、Bt株は既に記載されているように電気穿孔によって形質転換した(Lereclus et al., 1989)。

タンパク質分析は、Bt株の培養および超音波処理の後に行い、この分析は、0.1%SDS-12%PAGE上で行う。

#### 殺虫活性のバイオアッセイ

製材の毒性を、第二段階でのPlutella xylostellaの幼虫および以前に記載されている自由摂取法(Sanchis et al., 1988)を用いて評価する。



実施例 2Bt の S i g E<sup>-</sup> および s i g K<sup>-</sup> 突然変異体の構築

それぞれ s i g E および s i g K の K m<sup>R</sup> によって中断された遺伝子のコピーを含む p A B 1 および p A B 2 の熱感受性プラスミドを、電気穿孔によって B t 4 0 7 C r y<sup>-</sup> 株に導入する。s i g E および s i g K 遺伝子の s i g E<sup>-</sup> : K m および s i g K<sup>-</sup> : K m で中断したコピーによる置換は、非許容温度（4 0 ℃）でカナマイシンの存在下での形質転換体の連続培養によって得られる（第 1

図を参照されたい）。第 1 図から分かるように、p A B 1 または p A B 2 プラスミドによって形質転換された B t 株は、いずれも 3 7 ℃ でエリスロマイシンおよびカナマイシンに耐性である。

s i g E または s i g K 遺伝子がその中断されたコピーに交換された形質転換体を非許容温度、すなわちプラスミドの複製が遮断された温度で培養する。それらは、カナマイシンに対するそれらの耐性によって選択することができる。S p o 突然変異体（下記の 4 0 7 - S i g E<sup>-</sup> および 4 0 7 - S i g K<sup>-</sup>）は、カナマイシンに耐性であるが、エリスロマイシンには感受性である。B t s i g E および s i g K 遺伝子のそれらの中断されたコピーによる置換は P C R 分析によってチェックし、選択された突然変異体の染色体 D N A を P C R のマトリックスとして用い、それぞれの相補的外部配列をそれぞれ s i g E<sup>-</sup> 4 および s i g K<sup>-</sup> 4 オリゴヌクレオチドと組合わせてプライマーとして用いる。P C R 生成物の大きさは、K m<sup>R</sup> によって中断される遺伝子に相当する。

B t S i g E<sup>-</sup> および S i g K<sup>-</sup> 突然変異株は、胞子形成を行うことができない。耐熱性胞子は、H C T または S P 培地で 3 0 ℃ で 7 2 時間成育した後に生成しない。同様な成育条件では、野生株の細胞の少なくとも 9 0 % が 2 4 時間または 4 8 時間後に胞子形成する。位相差顕微鏡による細胞の検討では、s i g E<sup>-</sup> 突然変異株が初期の胞子形成段階で遮断され（段階 II）、非対称隔膜を形成した後、母細胞と胞子区画とに分裂する。s i g K<sup>-</sup> 突然変異株は後期胞子形成期（段階 IV）で遮断される。細胞の極の一方に位置する灰色の前胞子を、細胞の内部

に観察することができる。

*lacZ* 遺伝子と融合した *Bacillus subtilis* の *spoIID* および *cotA* 遺伝子のプロモーター領域を有する *pHTspoIID* および *pHTcotA* プラスミド (第2図を参照されたい) を構築して、*Bt* の孢子形成の際の  $\sigma E$  および  $\sigma K$  因子の出現および消失を観察する。*spoIID* を、 $\sigma E$  因子を含む RNA ポリ

メラーゼによって転写する (Lopez-Diaz et al., 1986; Rong et al., 1986)。この遺伝子は、段階IIにおける孢子の形態学的発生に関与している (Young and Mandelstam, 1979)。*cotA* 遺伝子は、孢子嚢タンパク質をコードし、その転写は  $\sigma K$  (Sandman et al., 1988) によって変化する。*pHTspoIID* および *pHTcotA* プラスミドを電気穿孔によって *Bt* 407  $Cry^{-}Spo^{+}$ 、407- $SigE^{-}$  および 407- $SigK^{-}$  に導入し、 $\beta$ -ガラクトシダーゼの合成を SP 培地での成育中に観察する (第3A図および3B図)。*Spo^{+}* 株では、*spoIID* プロモーターの制御下での  $\beta$ -ガラクトシダーゼの合成は t2 で開始し、t5 ではタンパク質が最大約 10,000 U/mg に達した後、減少する。 $\beta$ -ガラクトシダーゼの合成が *cotA* プロモーターの制御下にある菌株では、これは t6 だけで検出され、t11 にはタンパク質が最大 4000 U/mg に達する。*spoIID* または *cotA'*-*lacZ* 転写融合体に対する 407- $SigE^{-}$  突然変異体では、 $\beta$ -ガラクトシダーゼの発現は検出されない (タンパク質 10 U/mg 未満)。*sigK* の転写は  $\sigma E$  によって変化する (Sandman et al., 1988)、この突然変異株では因子 K は産生されない。407- $SigK^{-}$  突然変異株で *cotA* プロモーターから開始する *lacZ* の発現は検出されず、*spoIID* プロモーターから開始する発現は野生株と同様に t6 で最大となる。

### 実施例 3

#### *Bt* の $SigE^{-}$ および $SigK^{-}$ 突然変異株における *cryIAa'*-*lacZ* の発現

*Bt* の野生株および *Spo^{-}* 突然変異株における *cryIAa* 遺伝子のプロモーターの一過性調節 (temporal regulation) を測定するため、*cryIAa'*-*lacZ* 転写融合を含むプラスミドを構築した。*cryIAa* 遺伝子のプロモ-

ター領域を含む領域を、記載されている方法でPCRによって増幅した後、lacZリポーター遺伝子のpHT304-18Z上流でクローニングする。pHTcry1A2という名称で呼ばれる生成したプラスミドを、電気穿孔によってBt 407 Cry<sup>-</sup>Spo<sup>+</sup>、407-SigE<sup>-</sup>および407-SigK<sup>-</sup>株に導入する。Spo<sup>+</sup>407 Cry<sup>-</sup>株におけるβ-ガラクトシダーゼの産生はt2に開始し、t7に最初の、t11に第二の2個のピークを有する(第4図)。spoIID'-lacZおよびcotA'-lacZ融合体について示されているように、t7およびt11はσEおよびσKの発現の最大期に相当する。cry1Aaのプロモーター領域によって指示されたβ-ガラクトシダーゼの合成の発現は、407-SigE<sup>-</sup>では顕著に減少する(第4図)。しかしながら、若干のβ-ガラクトシダーゼ活性がt2で検出され、t10でタンパク質200U/mgの最大となる。cry1Aaのプロモーター領域によって指示されたβ-ガラクトシダーゼ合成はt2で開始し、突然変異株407-SigK<sup>-</sup>ではt7で最大値9000U/mgのタンパク質を示す(第4図)。Spo<sup>+</sup>株で後期胞子形成時の第二の発現ピークはSigK<sup>-</sup>突然変異株では現れず、これは、後期胞子形成期中のcry1Aa遺伝子の転写におけるσK因子の関与を示している。

#### 実施例4

##### BtのSigEおよびSigKにおけるCry1Aa毒素の産生

Bt 407の野生株のcry1Aa遺伝子を有するpHT410プラスミド(Lereclus et al., 1989)を、電気穿孔によってBt 407 Cry<sup>-</sup>Spo<sup>+</sup>、407-SigE<sup>-</sup>および407-SigK<sup>-</sup>株に導入する。

形質転換体を30℃でHCTおよびSp培地で培養し、結晶性封入体(crystalline inclusion)の産生を位相差顕微鏡法および電子顕微鏡法によって検討する。HCT培地で48時間成育したところ、大きな二ピラミッド型結晶が407-Spo<sup>+</sup>および407-SigK<sup>-</sup>形質転換体で見られる。しかしながら、Spo<sup>+</sup>株での結晶は、SigK<sup>-</sup>突然変異株の結晶が細胞壁にカプセル封入されたまま

であるのに、遊離する。HCT培地で72時間成育した後でも、SigK<sup>-</sup>突然変異株からの結晶性封入体は遊離しない。pHT410プラスミドを有する407-SigE<sup>-</sup>では、結晶は観察されない。

HCT培地で成育した細胞からの結晶-細胞および孢子-結晶製剤に含まれるタンパク質のSDS-PAGE分析では、pHT410を有する407-SigE<sup>-</sup>株は、pHT410を含む407-Cry<sup>-</sup>Spo<sup>+</sup>株から得られるのと同様な毒素を産生する同じプラスミドを有する407-SigK<sup>-</sup>とは異なり、130kDaのCry1Aaポリペプチドを産生しないことを示している。

孢子-結晶および細胞-結晶製剤の殺虫活性を、第二段階での*Plutella xylostella* 鱗翅類の幼虫を用いて分析する(第2表)。407-SigK<sup>-</sup>突然変異株におけるCry1Aa以外のタンパク質の存在を考慮すれば、この菌株の結晶性製剤での毒素の濃度を正確に測定することはできない。これは、LD50を培養容積によって定義して、これらの生成物の殺虫活性を評価するからである。このバイオアッセイは、407-SigK<sup>-</sup>で産生されるCry1Aa毒素は、*P. xylostella* の幼虫にとって極めて毒性が高いことを示している。しかしながら、これらの生成物の殺虫活性は、音波処理によって著しく増加する。

上記の実験条件下ではシグマKタンパク質を発現しないかまたは極めて弱くしか発現せず、第I-1634号でCNCMに寄託されている*Bacillus thuringiensis*株を、下記の条件下で構築する。

sigK遺伝子を含む菌株をカナマイシンに対する耐性を付与するaphA3遺伝子によって中断する。このようにして構築した菌株を、Cry1Aa遺伝子およびermC遺伝子を有するpHT410プラスミドによって形質転換して、エリスロマイシンに対する耐性を付与する。この非孢子形成株は、静止期1aにCry1Aa毒素を多量に産生する。

#### 実施例5

cry<sup>III</sup>A遺伝子のプロモーターの制御下でCry1C/Cry1A (b) キメラδ-内毒素をコードする遺伝子を発現するKto SigK<sup>-</sup> (pHTF3-IC/A (b)-IRS-T-Δ) と命名した*B. thuringiensis*の組換え菌株

### の構築

K t o 株は B. thuringiensis の天然の胞子形成株であり、この菌株は C r y 1 A (c) 型の  $\delta$ -内毒素を合成する。この  $\delta$ -内毒素は、米国および欧州におけるトウモロコシ作物の主要な害虫である Ostrinia nubilalis (アワノメイガ) の幼虫に対して殺虫活性を有する。一方、この  $\delta$ -内毒素 (従って、菌株 K t o) は、Spodoptera littoralis、Spodoptera exigua または Mamestra brassicae のようなヤガ科に属する他の重要な有害生物に対しては余り活性ではない (第3表を参照されたい)。逆に、C r y 1 C  $\delta$ -内毒素、または以下において C r y 1 C / C r y 1 A (b) と呼ばれる C r y 1 C / C r y 1 A (b) キメラ  $\delta$ -内毒素であって、その構築 (P H T 8 1 プラスミド) が Sanchis et al. (1989) によって追加的に記載されているものは、S. littoralis に対して活性を有するが、O. nubilalis に対しては余り活性でない (第3表)。

K t o 株の活性のスペクトルを増加するには、K t o 株に c r y 1 C 遺伝子またはキメラ c r y 1 C / A (b) 遺伝子を導入することが重要であった。しかしながら、既に1種類以上の他の  $\delta$ -内毒素遺伝子を含み、その発現も同様にシグマ E およびシグマ K 胞子形成因子によって変化する B. thuringiensis の1菌株への c r y 1 型遺伝子 (胞子形成に依存性) の導入は、 $\delta$ -内毒素の総生成量の増加によっては説明されないことが示されている。従って、c r y 1 型の様々な遺伝子を含む組換え菌株は、一層広い活性スペクトルを有するが、 $\delta$ -内毒素のそれぞれは余り産生せず、従って、標的とする昆虫のそれぞれに特異的な単独の  $\delta$ -内毒素を産生する菌株よりも標的昆虫のそれぞれに関する有効性は低くなる。

この現象は、この菌株に存在する様々な c r y 1 遺伝子のプロモーターによる胞子形成のシグマ因子の滴定効果によって説明することができる。この問題を解決するため、最近になり (Sanchis et al., 1996)、C r y 1 C タンパク質をコードする遺伝子を、発現がシグマ胞子形成因子 (Agaisse and Lereclus, 1994) とは独立している c r y <sup>III</sup> A 遺伝子のプロモーターの制御下に置くことができることが示された。

c r y <sup>III</sup> A プロモーターの制御下で c r y 1 C 遺伝子を K t o 株に導入して

、組換えKto (pHTF3-1C-IRS-Δ) 株を得た(Sanchis et al., 1996)。この組換え菌株は、同時にCry1A (c) およびCry1C毒素を産生し、産生されるδ-内毒素の量は、親菌株と比較して1.5～2倍だけ増加する。菌株Kto (pHTF3-1C-IRS-Δ) で得られる2種類のδ-内毒素Cry1A (c) およびCry1Cの総生成量の増加は、恐らくはこの菌株におけるcry1C遺伝子の発現は孢子形成の特異的シグマ因子によって変化しないことによるものであり、孢子形成に依存するcry1A (c) 遺伝子の発現を妨害しない。本明細書に記載のKto SigK<sup>-</sup> (pHTF3-1C/A (b) -IRS-T-Δ) 株を構築するため、S. littoralis に対する活性がCry1Cよりも若干勝っているキメラδ-内毒素Cry1C/A (b) をコードする遺伝子を、cry1C遺伝子(Sanchis et al., 1996)について以前に記載した通りにcry<sup>III</sup>A遺伝子のプロモーターの制御下に置いた。

同様に、Kto株のsigK<sup>-</sup>突然変異株 (このsigK遺伝子がaphA3遺伝子によって中断されている) を、pAB2プラスミド (第1図を参照されたい) を用いて実施例2に記載の方法で構築した。BtのSpo<sup>-</sup>突然変異株であるKto SigK<sup>-</sup>をHCT培地で30℃で48時間培養すると、かなりの量のCry1A (c) δ-内毒素を産生し、これは結晶性封入体の形態で蓄積し、細胞中にカプセル封入されたままになり、リーシスを受けない。O. nubilalis に

対するKto SigK<sup>-</sup>株の活性は、Kto SigK<sup>-</sup>株が予め音波処理されていてもまたはされていなくとも、Kto親株の活性と同等である。

次いで、Kto SigK<sup>-</sup>株を、pHTF3-1C/A (b) -IRS-Tプラスミドで形質転換した (第5図を参照されたい)。pBluescript II KS<sup>-</sup>由来のこのプラスミドは、Tn4430\_\_トランスポゾンの内部分割部位(internal resolution site) (IRS) を含む2個の配列を有する(Lereclus et al., 1986)。これらの2個のIRSは、pBluescript II KS<sup>-</sup>、およびテトラサイクリンに対する耐性を付与しかつBacillus cereus 由来のtet遺伝子の直ぐ両側に配置されている。更に、pHTF3-1C/A (b) -

IRS-Tは、cry<sup>III</sup>Aのp3プロモーターの制御下にあるキメラcry1C/A(b)のコード部および*B. thuringiensis*のpHT1030プラスミドの複製源を含んでいる(Lereclus and Arantes, 1992)。

形質転換の後、Kto SigK<sup>-</sup>株に含まれているTn4430トランスポゾンのTnpIインテグラーゼは、2個のIRS部位の間の組換え反応を触媒して、これらの2個の部位の間に含まれるDNAを切除する。組換えにより生じる2個の環状分子のうち、pHT1030プラスミドの複製源とキメラcry1C/A(b)遺伝子とを有するものだけが複製することができ、このようにして得られたpHTF3-1C/A(b)-IRS-T-Δと呼ばれるプラスミドは、pBluescriptII KS<sup>-</sup>およびtet遺伝子に相当するDNAを失っている(第6図を参照されたい)。Kto SigK<sup>-</sup>(pHTF3-1C/A(b)-IRS-T-Δ)組換え体菌株は、Cry1A(c)およびCry1C/A(b) δ-内毒素をかなりの量で産生し、従って親KtoまたはKto SigK<sup>-</sup>株よりも広い活性スペクトルを有するという利点を有する(第4表)。

。

更に、このような菌株は2つの他の利点を有する。

1.) Cry1A(c)およびCry1C/A(b) δ-内毒素は、細胞中にカプセル封入されたままである。これは、散布した後に分解および紫外線に対して付与される物理的保護により、処理を施した作物帯での毒素の持続性が増加することによると考えられる。

2.) sigK<sup>-</sup>突然変異株は、孢子形成過程の段階IVで遮断されたSpo<sup>-</sup>突然変異株であり、従って成育可能な孢子を産生せず、このような突然変異株の使用により、殺虫処理中に孢子の環境中への伝播を回避することができる。

第1表

## PCRプライマーとして用いるオリゴヌクレオチド配列

プライマー	配列	bpの位置 <sup>a</sup>	5' 端の制限部位
cryIA-1	5' CCCAAGCTTGCAGGTAATGGTTCTAAC3'	156-177	HindIII
cryIA-2	5' CGCGGATCCATCTCTTTTATTAAGATACC3'	495-518*	BamHI
sigE-1	5' CGGGATCCCGTTGAAAGCGTAGAGGTCAGAA3'	16-38**	BamHI
sigE-2	5' GCTCTAGAGCCAACGCGATGCATATGTTGCTA3'	834-855**	XbaI
sigE-3	5' GGAATTCCATTGTCTGACGTGTTAGGTACA3'	961-982**	EcoRI
sigE-4	5' CGGGATCCCGATACGCAATATCTCGCAATGA3'	1730-1751**	BamHI
sigK-1	5' CGGGATCCCGTCCAGTTATAATTTGAGCTCCAA3'	31-53**	BamHI
sigK-2	5' GCTCTAGAGCCCGATTGTACCAATTGAAAT3'	603-623**	XbaI
sigK-3	5' GGAATTCCATTAAAGCGATCGAGAGCTATT3'	627-648**	EcoRI
sigK-4	5' CGGGATCCCGGCACCTTCTAATATTACAGATAGAA3'	1194-1217**	BamHI
sigE-Ch	5' TTTTCTAAAAAGCGTATTGAA3'	1-22**	随
sigK-Ch	5' GGAGAAACCATAGTTATGAA3'	1-20**	随

<sup>a</sup> オリゴヌクレオチドの位置は、下記の文献から決定される：

• Wong et al., 1983、および \*\*Adams et al., 1991。



## 第2表

B t 菌株の殺虫活性

菌株	L D50 <sup>a</sup> 粉末化した食料の $\mu\text{l} / \text{ml}$ <sup>b</sup>
407 Spo <sup>+</sup> (pHT410)	14.7 (7.9-21.8)
407-SigK <sup>-</sup> (pHT410)	124.6 (68.6-1358.7)
407-SigK <sup>-</sup> (pHT410) 1分間音波処理 <sup>c</sup>	35.6 (15.2-71.2)
407-SigK <sup>-</sup> (pHT410) 5分間音波処理 <sup>d</sup>	9.5 (6.2-12.6)

<sup>a</sup> L D50は、昆虫の幼虫50%を殺すのに必要な製剤の溶液である。

<sup>b</sup> 葉の上に散布した溶液のml当たりの使用した孢子-結晶または細胞-結晶溶液の $\mu\text{l}$ 数。

<sup>c</sup> 細胞を1分間の音波処理によって部分的に破壊し、結晶性封入体の大部分は細胞の内部に残る。

<sup>d</sup> 細胞を5分間の音波処理によって完全に破壊すると、結晶の95%が遊離する。

第3表

S. littoralis および O. nubilalis に対して比較した Cry1A(c)、Cry1C および Cry1C/A(b)  $\delta$ -内毒素の活性

$\delta$ -内毒素	第二段階の幼虫に対するタンパク質/cm <sup>2</sup> のngでのLD50 <sup>(1)</sup>	
	S. littoralis	O. nubilalis
Cry1A(c)	1000	2
Cry1C	70	>250
Cry1C/A(b)	20	87

<sup>(1)</sup> LC50、または致死濃度50は、処理した個体数の50%を5日後に殺すのに要する $\delta$ -内毒素の濃度であり、生物学的試験はSanchis et al., 1996によって記載された方法で行った。

第4表

Bacillus thuringiensisの菌株の殺虫活性

菌株 (1)	菌株の特徴	第二段階の幼虫に対するタンパク質/cm <sup>2</sup> のngでのLD50	
		S. littoralis	O. nubilalis
Kto	Cry1A(c)を産生する天然の Spo <sup>+</sup> 株	981 (758-1270)	1.7 (0.9-3)
Kto (pHTF3-1C- IRS- $\Delta$ )	Cry1A(c)およびCry1Cを 産生するKto Spo <sup>+</sup> 株	25 (13-50)	<4.2
Kto SigK <sup>-</sup> (pHTF3- 1C/A(b)-IRS-T- $\Delta$ )	カプセル封入した形態でCry1A(c) およびCry1C/A(b)を産生する Kto <sup>-</sup> Spo <sup>-</sup> 株	11 (3-36)	2.6 (0.06-110)

(1) LC50は、処理した個体数の50%を5日間で殺すのに要する濃度であり、括弧内の値は95%信頼区間であり、生物学的試験はSanchis et al., 1996によって記載された方法で行った。

#### 参考文献

- Adams L.F., Brown K.L., Whiteley H.R. (1991) Molecular Cloning and characterization of two genes encoding sigma factors that direct transcription from a *Bacillus thuringiensis* crystal protein gene promoter. *J. Bacteriol.* 173:3846-3854.
- Agaisse H. et Lereclus D. (1994). Expression in *Bacillus subtilis* of the *Bacillus thuringiensis* cryIIIA toxin gene is not dependent on a sporulation-specific sigma factor and is increased in a spoOA mutant. *J. Bacteriol.*, 176:4734-4741.
- Agaisse H., Lereclus D. (1994b) Structural and functional analysis of the promoter region involved in full expression of the cryIIIA toxin gene of *Bacillus thuringiensis* *Mol. Microbiol.* 13:97-107.
- Donavan W.P., Zheng L., Sandman K., Lobsick R. (1987) Genes encoding sporecoat polypeptides from *Bacillus subtilis*. *J. Mol. Biol.* 196:1-10.
- Dulmage H.T. (1970) Insecticidal activity of HD-1, a new isolate of *Bacillus thuringiensis* var. *alesti*. *J. Invert. Pathol.* 15, 232-239.
- Gibson T.J. (1984) Studies on the Epstein-Barr virus genome.
- Lecadet M.M., Blondel M.O., Ribier J. (1980) Generalized transduction in *Bacillus thuringiensis* var. *berliner* 1715, using bacteriophage CP54 Ber. *J. Gen. Microbiol.* 121:203-212.
- Lereclus D., Mahillon J., Menou G. et Lecadet M-M. (1986). Identification of Tn4430 a transposon of *Bacillus thuringiensis* functional in *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.*, 204:52-57.
- Lereclus D. et Arantes O. (1992). *spbA* locus ensures the segregational stability of pHT1030, a novel type of Gram-positive replicon. *Mol. Microbiol.*, 7

:35-46.

Lereclus D., Agaisse H., Gominet M., Chaufaux J. (1995) Overproduction of encapsulated insecticidal crystal proteins in a *Bacillus thuringiensis* spo0A mutant. *Bio/Technology* 13:67-71.

Lereclus D., Arantes O., Chaufaux J., Lecadet M.M. (1989) Transformation and expression of a cloned  $\delta$ -endotoxin gene in *Bacillus thuringiensis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 60:211-218.

Lopez-Diaz I., Clarke S., Mandelstam J. (1986) SpoIID operon of *Bacillus subtilis*. cloning and sequence. *J. Gen. Microbiol.* 132:341-354.

Msadek T., Kunst F., Henner D., Klier A., Rapoport G., Dedonder R. (1990) Signal transduction pathway controlling synthesis of a class of degradative enzymes in *Bacillus subtilis*: expression of the regulatory genes and analysis of mutations in *degS* and *degU*. *J. Bacteriol.* 172:824-834.

Rong S., Rozenkrantz M.S., Sonenshein A.L. (1986) Transcriptional control of the *Bacillus subtilis* spoIID gene. *J. Bacteriol.* 165:771-779.

Sanchis V., Lereclus D., Menous G., Chaufaux J., Lecade M.M. (1988) Multiplicity of  $\delta$ -endotoxin genes with different specificities in *Bacillus thuringiensis aizawai* 7.29. *Mol. Microbiol.* 2:393-404.

Sanchis V., Lereclus D., Menou G., Chaufaux J., Guo S. et Lecadet M.M. (1989). Nucleotide sequence and analysis of the N-terminal coding region of the *Spodoptera* active  $\delta$ -endotoxin gene of *Bacillus thuringiensis aizawai* 7-29. *Mol. Microbiol.*, 3:229-238.

Sanchis V., Agaisse H., Chaufaux J. et Lereclus D. (1996). Construction of new insecticidal *Bacillus thuringiensis* recombinant strains by using the sporulation non-dependent expression system of cryIIIA and a site specific recombination vector. *J. Biotechnol.*, 48:81-96.

Sandman K.L., Lroos L., Cutting S., Youngman P., Losick R. (1988) Identification of a promoter for a spore coat protein in *Bacillus subtilis* and studies

on the regulation of its induction at a late stage of sporulation. *J. Mol. Biol.* 200:461-473.

Trieu-Cuot P., Courvalin P. (1983) Nucleotide sequence of the *Streptococcus faecalis* plasmid gene encoding the 3'5"-aminoglycoside phospho-transferase type III. *Gene* 23:331-341.

Villafane R., Bechhofer D.H., Narayanan C.S., Dubnau D. (1987) Replication control genes of plasmid pE194. *J. Bacteriol.* 169:4822-4829.

Wong H.C., Schnepf H.E., Whiteley H.R. (1983) Transcriptional and translational start sites for the *Bacillus thuringiensis* crystal protein gene. *J. Biol. Chem.* 258:1960-1967.

Young M., Mandelstam J. (1979) Early events during bacterial endospore formation. *Adv. Microb. Physiol.* 20:103-162.

Yoshisue H., Nishimoto T., Sakai H., Komano T. (1993) Identification of a promoter for the crystal protein-encoding gene *cryIVB* from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *Gene* 137:247-251.

Yoshisue H., Fukada T., Yoshida K.I., Sen K., Kurosawa S.I., Sakai H., Komano T. (1993) Transcriptional Regulation of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. Mosquito larvicidal crystal protein gene *cryIVA*. *J. Bacteriol.* 175:2750-2753.

Demande de brevet PCT W094/25612.

Demande de brevet PCT W093/02199.

Demande de brevet PCT W082/03872.

Demande de brevet PCT WO94/25612.  
Demande de brevet PCT WO93/02199.  
Demande de brevet PCT WO82/03872.  
Demande de brevet Européen 0 178 151.  
Demande de brevet Européen 0 224 331.  
Demande de brevet Européen 0 192 319.  
Demande de brevet Européen 0 228 838.  
Demande de brevet Européen 0 295 156.  
Demande de brevet Européen 0 349 353.

【図1】

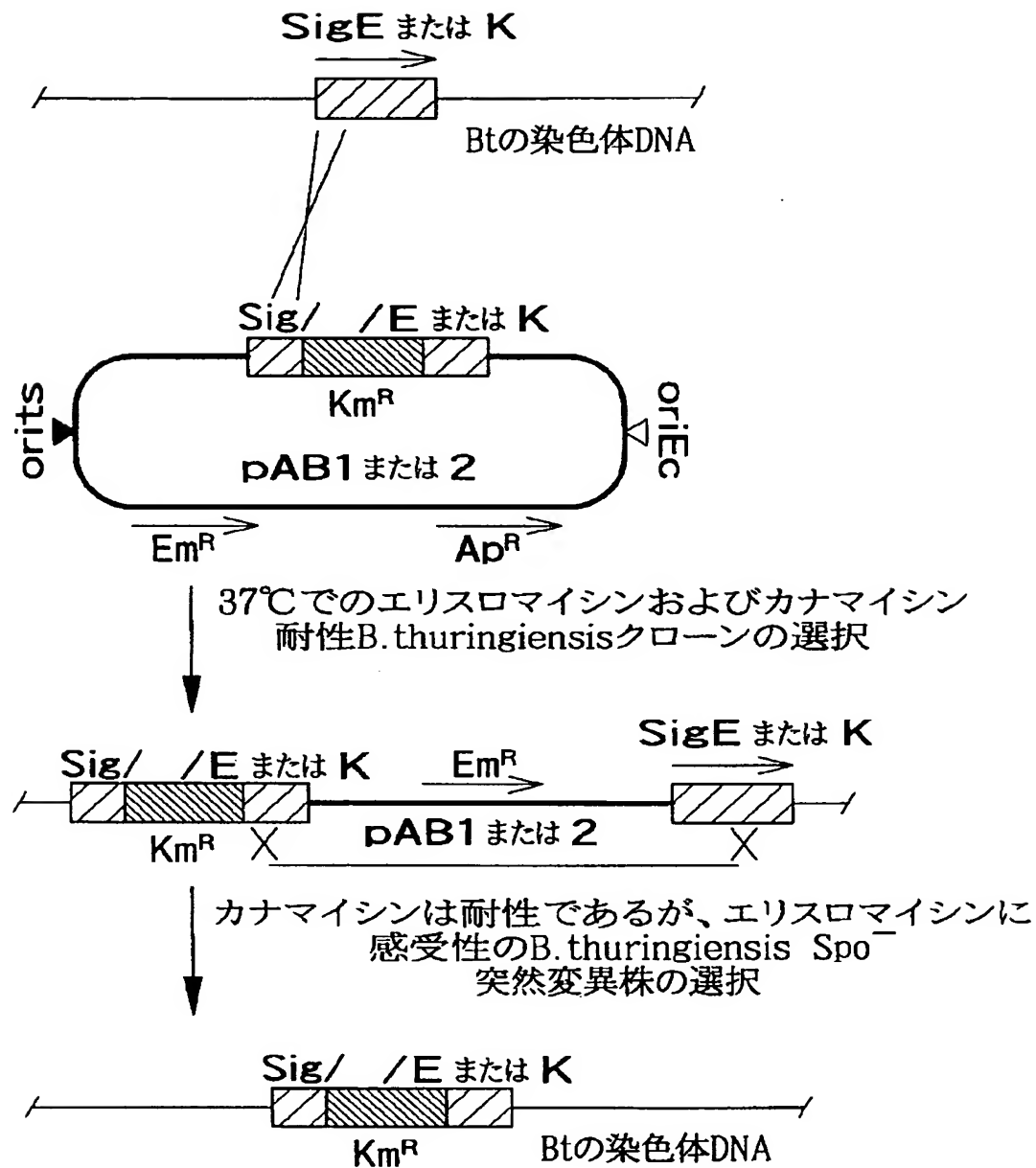


FIG. 1

【図2】

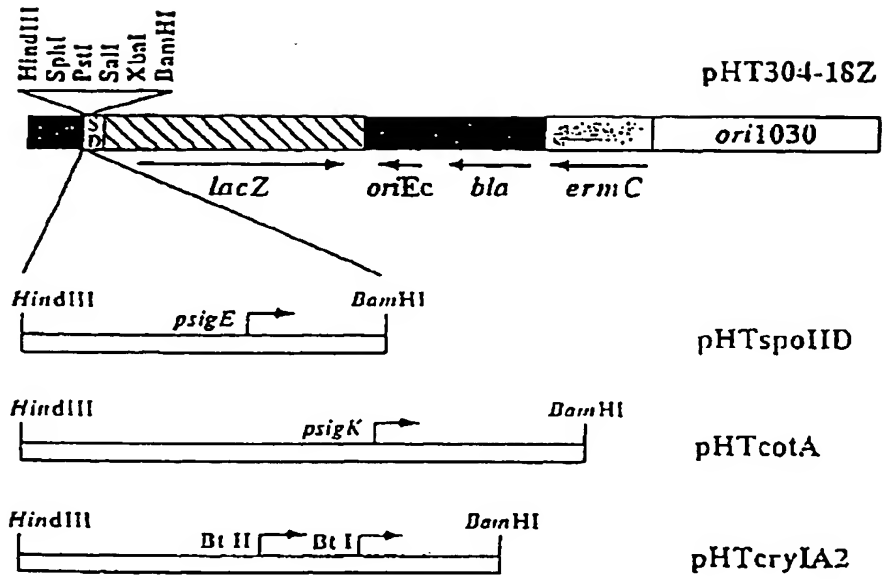


FIG.2



【図3】

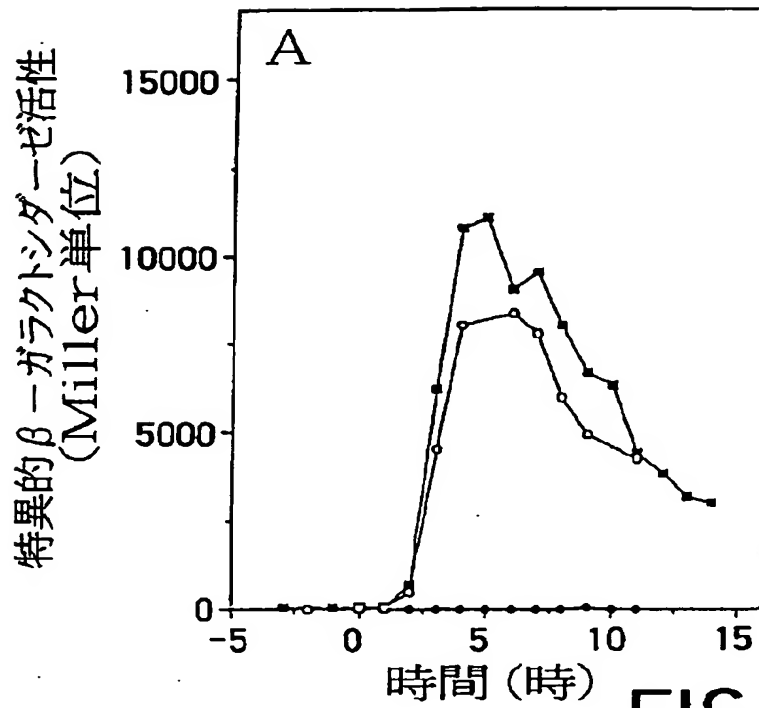


FIG.3A

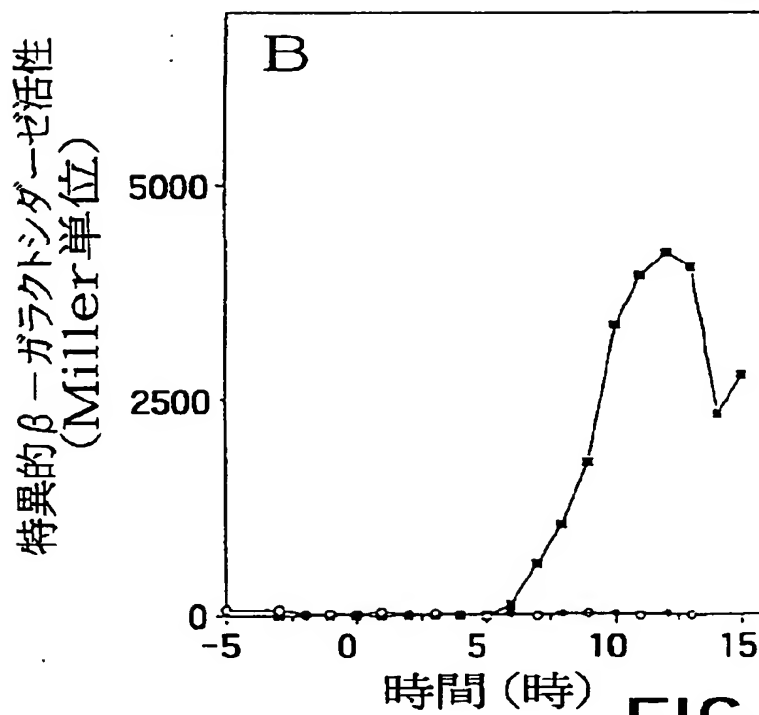


FIG.3B

【図4】

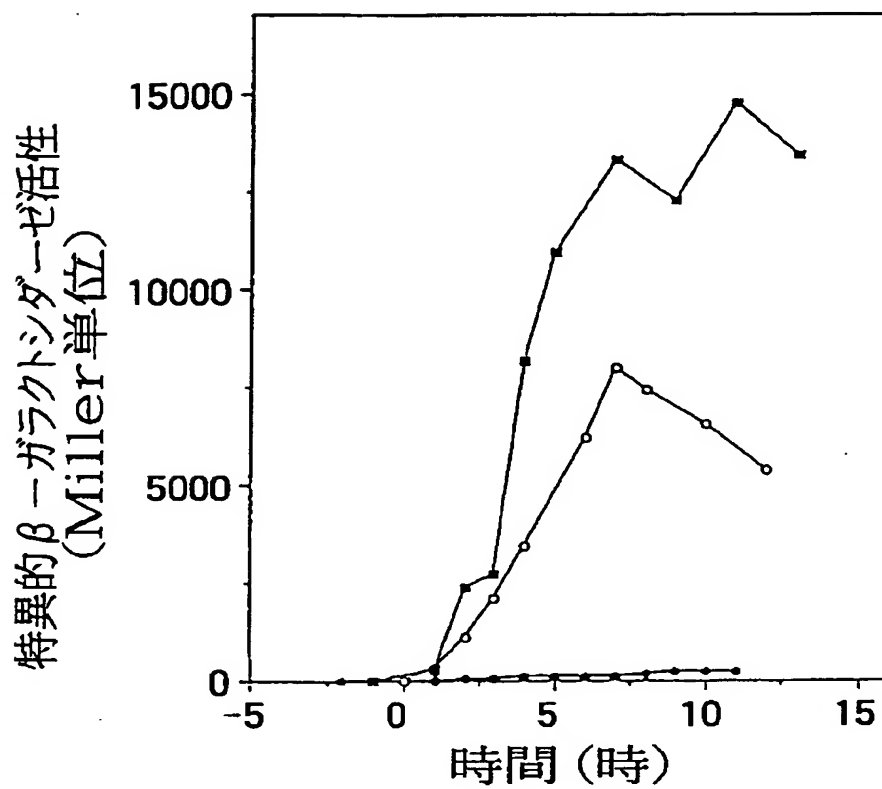


FIG.4

【図5】

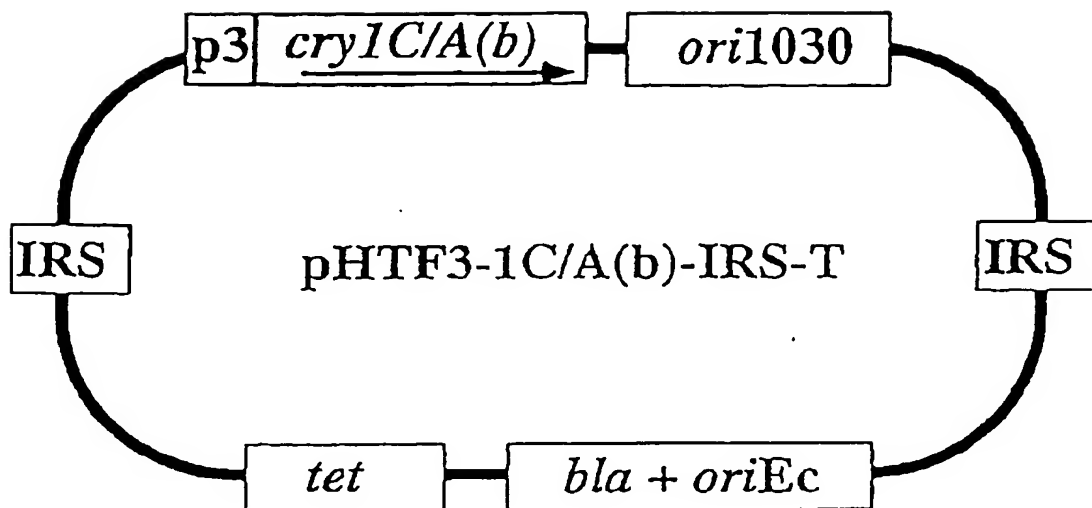


FIG.5

【図6】

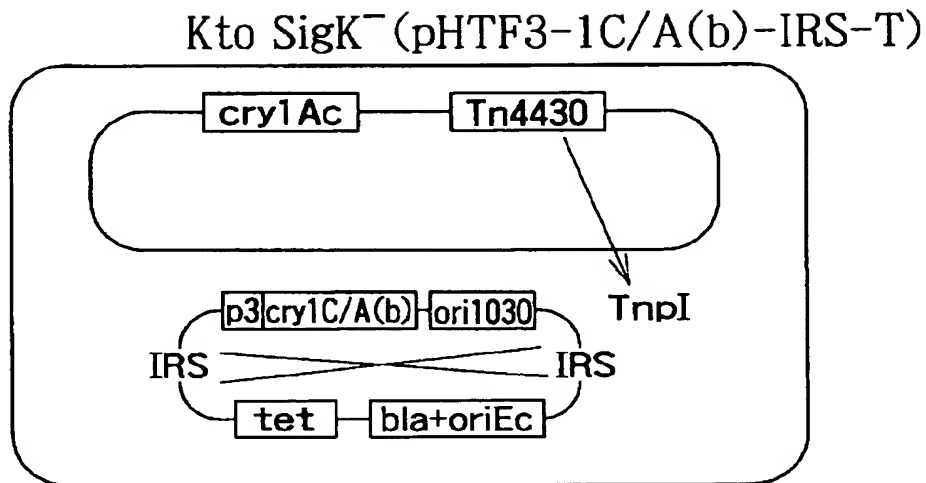


FIG. 6A

テトラサイクリンに対する選択圧力の不存在下における  
TnpIによりイン・ピボで触媒される特異的組換え部位

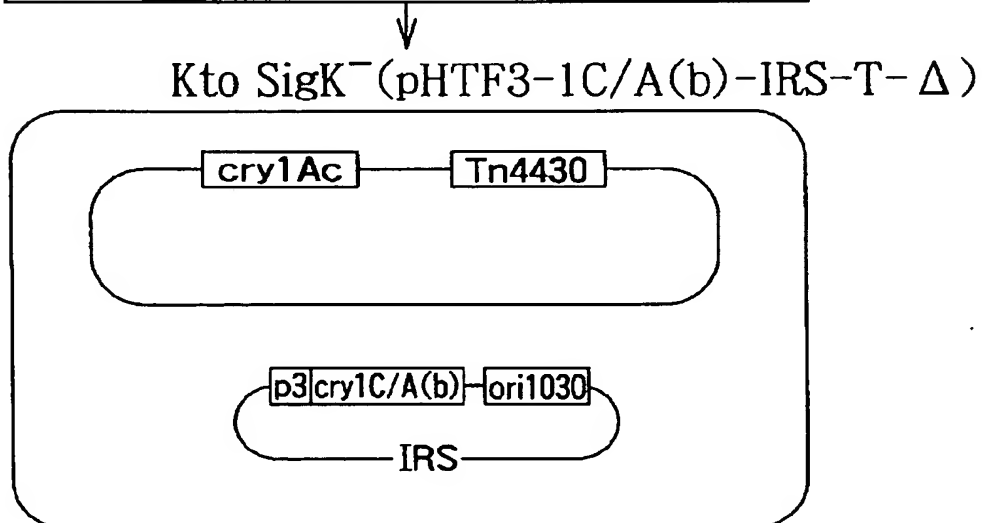


FIG. 6B

## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inventor's National Application No. PCT/FR 96/01684	
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 6 C12N15/32 C07K14/325 A01N63/00 C12N1/21 //C12N15/62, C12N15/90, (C12N1/21, C12R1:07)	
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC	
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 6 C12N C07K A01N	
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched	
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)	
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT	
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages
X	BIOTECHNOLOGY, vol. 13, January 1995, NEW YORK US, pages 67-71, XP002007696 LERECLUS, D. ET AL.: "Overproduction of encapsulated insecticidal crystal proteins in a <i>Bacillus thuringiensis</i> spo8A mutant" cited in the application see the whole document ---
A	JOURNAL OF BACTERIOLOGY, vol. 173, no. 12, June 1991, pages 3846-3854, XP000574980 ADAMS, L. ET AL.: "Molecular cloning and characterization of two genes encoding sigma factors that direct transcription from a <i>Bacillus thuringiensis</i> crystal protein gene promoter" cited in the application ---
	-/--
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.	<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.
* Special categories of cited documents:	
*A' document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	*T' later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
*E' earlier document but published on or after the international filing date	*X' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
*L' document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	*Y' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
*O' document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	*A' document member of the same patent family
*P' document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
Date of the actual completion of the international search 14 April 1997	Date of mailing of the international search report 22.04.97
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentkan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-78) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+31-78) 340-3016	Authorized officer Andres, S

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Patent Application No.

PCT/FR 96/01684

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 5 262 159 A (PAYNE JEWEL M ET AL) 16 November 1993 see column 9, line 18 - column 10 see example 5 ---	15-21
P,X	MOLECULAR & GENERAL GENETICS 250 (6). 734-741, 10 April 1996, XP002007697 BRAVO, A. ET AL.: "Analysis of cryIAa expression of sigE and sigK mutants of Bacillus thuringiensis." see the whole document ---	1-13
T	JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY, (1996 JUL 18) 48 (1-2) 81-96., XP002029349 SANCHIS V ET AL: "Construction of new insecticidal Bacillus thuringiensis recombinant strains by using the sporulation non-dependent expression system of cryIIIA and a site specific recombination vector." see page 91, left-hand column, last paragraph - page 93, left-hand column, paragraph 1 -----	14

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/FR 96/01684

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5262159 A	16-11-93	AU 4998693 A	15-03-94
		BR 9305617 A	09-01-96
		CA 2117270 A	03-03-94
		CN 1085387 A	20-04-94
		EP 0617736 A	05-10-94
		JP 7503857 T	27-04-95
		WO 9404684 A	03-03-94
		US 5468636 A	21-11-95
-----			

## フロントページの続き

(51)Int.Cl. <sup>8</sup>	識別記号	F I
C 1 2 R 1:07)		
(C 1 2 N 1/21		
C 1 2 R 1:07)		
(72)発明者	ルレキュルス, ディディエ	
	フランス国バリ、リュ、セザールーフラン	
	ク、12	
(72)発明者	アゲス, エルベ	
	フランス国バリ、ブールバール、バストゥ	
	ール、54	
(72)発明者	サラミトゥー, シルビ	
	フランス国モル、リュ、ドルレアン、55	
(72)発明者	サンシ, バンサン	
	フランス国バリ、リュ、ドミエ、14	